

## Novo método enzimático rápido e sensível de extração e dosagem de amido em materiais vegetais

Lourdes Isabel Velho do Amaral<sup>1</sup>, Marília Gaspar<sup>2</sup>, Paula Moreira Felix Costa<sup>2</sup>,  
Marcos Pereira Marinho Aidar<sup>2</sup> e Marcos Silveira Buckeridge<sup>3,4</sup>

Recebido: 10.08.2006; aceito: 10.09.2007

**ABSTRACT** - (A new rapid and sensitive enzymatic method for extraction and quantification of starch in plant material). In this work we compare methods normally used for starch determination in plant materials. The comparison between chemical (McCready's method) and an enzymatic method proposed here showed that although McCready's method is appropriate for most plant materials, in certain cases where cell wall polysaccharides (pectins and hemicelluloses) are present, the results may be significantly altered. However, using the enzymatic method described here afforded accurate estimation of starch content in such tissues. The enzymatic method proposed in this work is an affordable option for precise determination of starch contents in several plant tissues.

**Key words:** hydrolases, starch, storage carbohydrates

**RESUMO** - (Novo método enzimático rápido e sensível de extração e dosagem de amido em materiais vegetais). Neste trabalho é feita uma comparação entre os métodos mais comumente utilizados para a dosagem de amido em materiais vegetais. A comparação entre um método químico (McCready) e o método enzimático proposto neste trabalho mostra que, embora o primeiro seja apropriado para a maioria dos materiais vegetais, nos casos em que polissacarídeos de parede celular (pectinas e hemiceluloses) estão presentes, os resultados podem ser bastante alterados. Entretanto, ao usar o método enzimático apresentado, foi possível obter estimativas acuradas dos conteúdos de amido de diversos tecidos vegetais. O método proposto neste trabalho é uma opção viável para determinação do conteúdo de amido em diversos tecidos de plantas.

**Palavras-chave:** amido, carboidratos de reserva, hidrolases

### Introdução

O amido é um dos principais compostos de reserva em plantas. Ao longo da evolução tem sido usado não somente como reserva para a própria planta, mas também como uma das mais importantes fontes de energia para os níveis subseqüentes da cadeia alimentar nos ecossistemas (Zeeman *et al.* 2004). Por esta razão, vários organismos adquiriram a capacidade de produzir enzimas que degradam o amido com subseqüente liberação de glucose e uso no metabolismo energético.

O amido é composto por unidades de glucose, organizadas em dois homopolissacarídeos, a amilose e a amilopectina. A amilose praticamente não apresenta ramificações, sendo que as unidades de

glucose são conectadas por ligações glicosídicas do tipo  $\alpha$  (1,4) e a porcentagem de ramificações  $\alpha$  (1,6) é menor do que 1% (Ball *et al.* 1998). A amilopectina, uma das maiores biomoléculas conhecidas, é altamente ramificada e possui cadeias de resíduos de glucose ligados entre si por ligações glicosídicas do tipo  $\alpha$  (1,4) com aproximadamente 5% de ramificações  $\alpha$  (1,6) (Myers *et al.* 2000). Dependendo da origem, o amido possui diferentes proporções de amilose e de amilopectina. Normalmente as proporções variam em torno de 1:3 e 1:4, mas há extremos encontrados em mutantes, como nos mutantes "waxy" de milho, cujo amido não possui amilose (Nelson & Pan 1995).

Em células vegetais, o amido é armazenado na forma de grânulos insolúveis em água que são localizados em organelas especiais. No caso das folhas,

1. Universidade Federal de Brasília, Departamento de Botânica, Caixa Postal 04457, 70910-970 Brasília, DF, Brasil

2. Instituto de Botânica, Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas, Caixa Postal 3005, 01061-970 São Paulo, SP, Brasil

3. Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências, Departamento de Botânica, Caixa Postal 11461, 05422-970 São Paulo, SP, Brasil

4. Autor para correspondência: msbuck@usp.br

o amido é sintetizado e armazenado nos cloroplastos ou nos amiloplastos. Nos cloroplastos, o amido é produzido durante o período fotossintético, sendo rapidamente metabolizado durante o período noturno (Beck & Ziegler 1989). Os amiloplastos são encontrados em vários tecidos e órgãos não fotossintetizantes como parênquima de raízes e caules, tubérculos, endosperma ou cotilédones de sementes.

Muitas enzimas, a maioria delas hidrolases, estão envolvidas na mobilização do amido. As cadeias de glucose podem ser atacadas de forma endo (no centro da molécula) ou exo, isto é na porção terminal não redutora da molécula (Buckeridge *et al.* 2004).

O ataque endo é efetuado pela  $\alpha$ -amilase (EC 3.2.1.1), responsável pela quebra de ligações do tipo  $\alpha$ (1,4) internas ao polissacarídeo. Esta é a enzima que ataca o grânulo de amido intacto. Em seguida, os oligossacarídeos (maltodextrinas) formados pela ação da  $\alpha$ -amilase são atacados pelas exo-glucanases. O amido também pode ser atacado por uma exo-enzima, a  $\beta$ -amilase (EC 3.2.1.2), que libera unidades de maltose a partir do final não redutor do glucano e  $\alpha$ (1,6)-glucanases específicas atacam os oligossacarídeos ramificados (não atacados pela  $\alpha$ -amilase) liberando maltose. Este dissacarídeo é finalmente hidrolisado a glucose pela  $\alpha$ -glucosidase (Beck & Ziegler 1989).

Estudos recentes têm demonstrado que a  $\beta$ -amilase é uma enzima importante para a degradação do amido em folhas (Smith *et al.* 2005). Evidências de seu papel na degradação do amido transitório (amido acumulado nos cloroplastos durante o período fotossintético) foram obtidas pela supressão do gene de  $\beta$ -amilase em plantas transgênicas de batata (Scheidig *et al.* 2002) e *Arabidopsis* (Kaplan & Guy 2004), que apresentaram fenótipo de acúmulo de amido nas folhas.

Nos órgãos de reserva, outras isoformas da  $\alpha$ -glucosidase (EC 3.2.1.41) removem os resíduos  $\alpha$ -glucosil a partir de fragmentos de amido de diversos pesos moleculares, mas são pouco efetivas contra o grânulo de amido intacto, podendo substituir outras enzimas desramificadoras. A  $\alpha$ -glucosidase apresenta uma grande semelhança com a amiloglucosidase (ou glucoamilase) encontrada em fungos como o *Aspergillus niger* e é muito utilizada em pesquisa de amido e biotecnologia (Avigad & Dey 1997).

Existem vários métodos para quantificação de amido descritos na literatura. As principais etapas compreendidas nos diferentes métodos são a

gelatinização, a solubilização e a hidrólise do amido. O processo de gelatinização visa a hidratação dos grânulos. Este processo consiste em aquecer o tecido contendo amido em água ou etanol ferventes, o que facilita o acesso dos reagentes de solubilização e hidrólise ao polímero (Manners 1985). A solubilização ocorre pela quebra do polímero em fragmentos menores de amilose e amilopectina, através da utilização de ácido perclórico ou de uma solução alcalina diluída (McCready 1970). Por fim, é através da quebra dos polímeros de amilose e amilopectina em unidades individuais de glucose, usando o processo de hidrólise por ácidos fortes ou digestão enzimática, que os açúcares são liberados e detectados por métodos colorimétricos.

Dentre os métodos químicos de dosagem de amido disponíveis na literatura científica, o de McCready *et al.* (1950) é um dos mais conhecidos. Este método é baseado na solubilização do amido por ácido perclórico (Purcher *et al.* 1948) ou ácido sulfúrico (Steiner & Guthrie 1944) e subsequente quantificação por antrona (Jermyn 1956) ou por fenol seguido de ácido sulfúrico (Dubois *et al.* 1956). Apesar de ser relativamente trabalhoso, esse método foi amplamente utilizado no Brasil até a década de 70, devido a sua precisão. É um método excelente para espécies que possuem como reserva principal o amido, como é o caso da batata e grãos em geral, mas não é adequado para tecidos que apresentam outros polissacarídeos além do amido. De fato, o ácido perclórico pode extrair e hidrolisar outros polissacarídeos de parede celular como as pectinas e até polissacarídeos menos solúveis, como xilanos (Bennet 1955). Este aspecto da metodologia introduz grandes variações nos resultados finais, superestimando a quantidade de amido nos tecidos e tornando os resultados menos acurados.

Outros métodos químicos têm sido utilizados em substituição ao método de McCready, mas apenas para a extração do material, sendo que os procedimentos recentes de quantificação de amido envolvem sua hidrólise e dosagem através do uso de enzimas específicas. Existem dois reagentes amplamente utilizados para extração de amido, o hidróxido de sódio (NaOH) (Áreas & Lajolo 1980) e o dimetil sulfoxido (DMSO) (Carpita & Kanabus 1987). O NaOH é comumente utilizado na solubilização e separação de polissacarídeos de parede celular. Soluções diluídas de NaOH extraem pectinas metil-esterificadas e hemiceluloses, como o xiloglucano

(Gorshkova *et al.* 1996), o que leva a superestimar o conteúdo de amido. O uso de DMSO também apresenta limitações. Este reagente pode extrair hemiceluloses da parede celular, especialmente arabinosilanos, como verificado para folhas de milho e para suspensões celulares de tabaco (Carpita & Kanabus 1987).

No caso dos métodos enzimáticos, apesar da precisão de ataque das enzimas de hidrólise do amido, o uso de enzimas como amiloglicosidase ou glucoamilase, tem que ser feito com muito cuidado, pois frequentemente os extratos comerciais apresentam contaminação por celulases e outras glucoamilases que liberam monossacarídeos de polímeros da parede celular.

Cada metodologia tem um tipo de limitação, alterando precisão e acurácia dos resultados em diferentes níveis. Com base no conhecimento existente sobre as metodologias química e enzimáticas, o presente trabalho objetivou desenvolver um método enzimático rápido, altamente específico e de baixo custo para ser utilizado com qualquer tecido vegetal que contenha amido, inclusive aqueles que apresentem outros polissacarídeos, como as pectinas, que podem ocorrer em quantidades apreciáveis em frutos, os frutanos, que podem ser encontrados em folhas e órgãos subterrâneos e os polissacarídeos de parede celular de sementes, encontrados em diversas espécies de plantas. O procedimento foi descrito oferecendo alternativas para uso na determinação quantitativa de amido em tecidos vegetais de diferentes origens, mesmo que estes contenham grandes quantidades de outros carboidratos interferentes.

### Material e métodos

Os materiais vegetais utilizados foram escolhidos em função de seus carboidratos de reserva. Foram escolhidos materiais ricos em amido tais como: sementes de feijão carioca (*Phaseolus vulgaris*), de milho (*Zea mays*) e de arroz (*Oryza sativa*); tubérculos de batata inglesa (*Solanum tuberosus*) e frutos de banana nanica (*Musa paradisiaca*). Visando determinar a interferência de outros açúcares no conteúdo de amido estimado pelos diferentes métodos, foram utilizados materiais que acumulam diferentes tipos de carboidratos de reserva, como rizóforos de *Vernonia herbacea*, ricos em frutanos e cotilédones de jatobá (*Hymenaea courbaril*), ricos

em xiloglucano. Folhas de jatobá foram escolhidas como tecido que apresenta baixo teor de amido transitório estocado nos cloroplastos. O material vegetal foi liofilizado por 48 horas e pulverizado em moinho de bola (TECNAL), com exceção das sementes, que não passaram pelo processo de liofilização.

Os seguintes polissacarídeos purificados foram utilizados como controle: amido solúvel (MERCK), celulose microcristalina (SIGMA) e xiloglucano de jatobá, purificado segundo Buckeridge *et al.* (2000).

Para as dosagens de amido, foram utilizados 10 mg de cada material vegetal. Para a retirada dos açúcares, pigmentos, fenóis e outras substâncias solúveis foram realizadas quatro extrações com 500  $\mu$ L de etanol 80% a 80 °C por 20 min, totalizando 2 mL de extrato etanólico. Após remoção da fração etanólica, o precipitado foi seco a temperatura ambiente durante a noite, até a completa evaporação do etanol. A seguir, foram adicionados 0,5 mL (120 U mL<sup>-1</sup>) de  $\alpha$ -amilase (EC 3.2.1.1) termoestável de *Bacillus licheniformis* (cód. E-ANAAM, MEGAZYME, Irlanda), diluída em tampão MOPS 10 mM pH 6,5. As amostras foram incubadas a 75 °C por 30 min. Este procedimento foi repetido mais uma vez totalizando 120 unidades de enzima. As amostras foram resfriadas até 50 °C, e então se adicionou 0,5 mL de uma solução contendo 30 U mL<sup>-1</sup> de amiloglicosidase (EC 3.2.1.3) de *Aspergillus niger* (cód. E-AMGPU, MEGAZYME, Irlanda) em tampão acetato de sódio 100 mM pH 4,5. As amostras foram incubadas a 50 °C por 30 min. Este procedimento foi repetido mais uma vez. Após as incubações descritas acima, foram acrescentados 100  $\mu$ L de ácido perclórico 0,8 M para parar a reação e precipitar proteínas. Após uma rápida centrifugação (2 min a 10.000 g), procedeu-se à dosagem de amido nos extratos, através de quantificação da glucose liberada no processo de hidrólise. Para tal foram retiradas alíquotas de 20  $\mu$ L de extrato, às quais foram adicionados 300  $\mu$ L do Reagente Glucose PAP Liquiform (CENTERLAB, Brasil), contendo as enzimas glucose-oxidase (~11000 U mL<sup>-1</sup>) e peroxidase (~700 U mL<sup>-1</sup>), 290  $\mu$ mol L<sup>-1</sup> de 4-aminoantipirina e 50 mM de fenol pH 7,5. Neste sistema, a glucose oxidase catalisa a oxidação da glucose. O peróxido de hidrogênio formado na reação reage com 4-aminoantipirina e fenol, sob ação catalisadora da peroxidase, através de uma reação oxidativa de acoplamento formando uma antipirilquinonimina

vermelha, cuja intensidade de cor é proporcional à concentração de glucose na amostra. Após incubação por 15 min a 37 °C, o teor de glucose foi determinado em leitor de microplacas de ELISA em comprimento de onda 490 nm. Para a confecção da curva padrão foi utilizada solução de glucose (SIGMA), nas concentrações de 0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10 µg mL<sup>-1</sup>.

Alternativamente, procedeu-se à hidrólise de amido das amostras utilizando somente a enzima amiloglucosidase de *A. niger* (cód. E-AMGPU, MEGAZYME) em tampão acetato de sódio 100 mM pH 4,5, conforme sugerido por McRae (1971). As amostras foram incubadas com 0,5 mL (30 U mL<sup>-1</sup>) de amiloglucosidase a 50 °C por 30 minutos. Este procedimento foi repetido mais uma vez.

Para fins de comparação com o método proposto, todas as amostras foram extraídas com ácido perclórico (McCready *et al.* 1950), com subsequente quantificação da glucose liberada pelo método de antrona (Jermyn 1956). Para amostras ricas em carboidratos de reserva (rizóforos de *Vernonia* e cotilédones de jatobá) foi feita dosagem do amido com e sem prévia precipitação com 5 volumes de etanol dos carboidratos de reserva presentes na amostra.

Para os frutos de banana, em substituição ao método de ácido perclórico, foi utilizada a metodologia descrita por Arêas & Lajolo (1980), que consiste em

extração com NaOH 0,5 M e subsequente hidrólise do amido pela amiloglucosidase.

## Resultados

Os resultados obtidos pelo novo método enzimático proposto e descrito anteriormente, que utiliza α-amilase termoestável associada à amiloglucosidase, encontram-se na tabela 1.

Em nenhum dos procedimentos utilizados se observou hidrólise da celulose. Esta foi portanto utilizada como controle negativo, indicando que as enzimas não apresentavam contaminação por outras endoglucanases, pois os valores estavam próximos daqueles apresentados pelo ácido perclórico. O amido solúvel (controle positivo) foi hidrolisado completamente com ácido perclórico e com o novo método enzimático proposto (α-amilase termoestável associada à amiloglucosidase). Quando essas amostras de amido solúvel foram incubadas somente com a enzima amiloglucosidase, a porcentagem de hidrólise caiu sensivelmente, indicando possível retrogradação (interação molecular irreversível das cadeias de glucanos) deste amido, talvez pelas condições de armazenamento. Estes resultados mostram que mesmo o amido retrogradado, que normalmente é resistente à hidrólise por

Tabela 1. Análise comparativa da porcentagem (%) de hidrólise de amido em amostras controle e em diferentes materiais vegetais realizada por 3 diferentes métodos: novo método enzimático (α-amilase termoestável + amiloglucosidase), hidrólise com amiloglucosidase (McRae 1971) e hidrólise com ácido perclórico (McCready 1950). Para frutos de banana foi utilizada a metodologia de Arêas & Lajolo (1980) em substituição ao ácido perclórico. Média (n = 3) ± SD.

Amostras	Métodos de dosagem de amido		
	α-amilase termoestável + amiloglucosidase	Amiloglucosidase	Acido perclórico
Amido solúvel	101,76 ± 3,22	38,65 ± 1,34	97,73 ± 3,75
Celulose	1,13 ± 0,05	0,23 ± 0,01	1,81 ± 0,20
Xiloglucano purificado	0,36 ± 0,11	0,37 ± 0,01	41,16 ± 3,60 <sup>1</sup> 0,69 ± 0,08 <sup>2</sup>
Tubérculos de batata	61,88 ± 1,13	24,03 ± 1,40	66,28 ± 3,76
Sementes de feijão	44,17 ± 4,23	12,99 ± 1,19	46,93 ± 2,94
Sementes de milho	56,11 ± 2,56	23,10 ± 1,32	53,39 ± 3,20
Sementes de arroz	76,31 ± 2,17	74,16 ± 2,96	76,65 ± 2,70
Frutos de banana	17,28 ± 1,17	1,92 ± 0,03	16,78 ± 1,59
Folhas de jatobá	26,75 ± 2,47	24,61 ± 1,61	27,27 ± 3,05
Cotilédones de jatobá	5,89 ± 0,81	4,99 ± 2,3	32,61 ± 2,80 <sup>1</sup> 4,89 ± 1,59 <sup>2</sup>
Rizóforos de <i>Vernonia</i>	0,44 ± 0,25	0,37 ± 0,12	45,19 ± 4,60 <sup>1</sup> 2,22 ± 0,19 <sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dosagem sem precipitação prévia com etanol dos carboidratos de reserva presentes na amostra; <sup>2</sup>dosagem após precipitação com etanol dos carboidratos de reserva presentes na amostra.



amiloglucosidade, foi eficientemente quantificado pelo novo protocolo proposto. Além disso, vale salientar que o uso de ambos os métodos ao mesmo tempo pode ser uma opção interessante para encontrar os percentuais de amido resistente em tecidos vegetais, alimentos e ainda em extratos ou alimentos armazenados.

O ácido perclórico foi inadequado para dosar amido em amostras ricas em outros polissacarídeos de reserva, como cotilédones de jatobá, que acumulam xiloglucano, ou em rizóforos de *Vernonia herbacea*, que acumulam frutanos. Quando os polissacarídeos foram retirados das amostras por precipitação em álcool, os valores foram muito próximos aos obtidos com os métodos enzimáticos (tabela 1). Fica claro que a presença desses polímeros solúveis em água nos tecidos vegetais superestima as dosagens de amido por este método.

Os amidos de feijão, milho e batata foram hidrolisados eficientemente com o método enzimático proposto ( $\alpha$ -amilase termoestável associada à amiloglucosidase) e com ácido perclórico, mas foram hidrolisados apenas parcialmente pela amiloglucosidase. Para o amido da batata, a enzima  $\alpha$ -amilase termoestável utilizada no novo método se mostrou altamente eficiente, uma vez que  $\alpha$ -amilases originadas de fungo, bactérias ou de animais foram incapazes de degradar os grãos de amido da batata (Walker & Hope 1963).

O método enzimático proposto hidrolisou de modo eficiente o amido de banana, pois os valores obtidos (17,28%) foram comparáveis aos obtidos com o método de Arêas & Lajolo (16,78%) (tabela 1). Novamente, o uso da enzima amiloglucosidase isoladamente não foi eficiente para hidrolisar o amido de banana.

Para sementes de arroz e folhas de jatobá, o uso de uma única enzima (amiloglucosidase) isoladamente foi suficiente para degradar todo o amido presente, obtendo-se valores próximos aos do ácido perclórico. No caso do arroz, o tamanho dos grânulos é relativamente pequeno e há um alto conteúdo de amilopectina. Estes fatores provavelmente facilitam a solubilização do amido e conseqüentemente seu acesso às enzimas. Já o amido das folhas de jatobá é acumulado de forma transitória e por esta razão é facilmente hidrolisado, devido a um menor grau de empacotamento e maior suscetibilidade à ação da enzima  $\alpha$ -glucosidase (similar à amiloglucosidase) *in vivo* (Sun *et al.* 1995).

## Discussão

Os métodos enzimáticos apresentam uma alta especificidade e possuem a vantagem de tornar mensurável o amido contido em pequenas amostras (entre 10 e 20 mg de massa seca) (McRae 1971, Haissig & Dickson 1979). O método desenvolvido por McRae (1971) requer gelatinização do grânulo de amido por aproximadamente 3 horas e utilização de uma glucoamilase. Porém, no presente trabalho, a quantidade de amido presente nas amostras analisadas foi subestimada por este método em relação ao quantificado pelo método químico (McCready *et al.* 1950). O método de McRae (1971) foi otimizado por Haissig & Dickson (1979), que alteraram o tempo de gelatinização para 1 hora e utilizaram uma  $\alpha$ -amilase de *Aspergillus oryzae*, além da glucoamilase de *Aspergillus niger*. Embora a quantificação do amido tenha sido adequada para as amostras testadas pelos autores, para outras amostras como a batata andina e feijão, testadas em nosso laboratório, este método foi ineficiente (dados não mostrados). Além disso, o passo da gelatinização com água fervente, anterior à incubação com as enzimas de hidrólise, pode retirar outros componentes além do amido, prejudicando análises posteriores, como o fracionamento de parede celular. No novo método proposto, a gelatinização é feita concomitantemente à ação da  $\alpha$ -amilase, que por ser termoestável permite incubação em temperaturas mais altas.

Vários métodos de extração têm sido utilizados para remover o amido de amostras vegetais. Atualmente são considerados mais adequados os métodos enzimáticos, em contraste com os métodos químicos. Apesar de estar diminuindo em popularidade, o método desenvolvido por McCready (1950) continua sendo recomendável se for considerada a relação custo-benefício, exceto para amostras que contenham uma quantidade muito grande de outros carboidratos interferentes, como frutanos ou xiloglucanos.

Normalmente, nos métodos enzimáticos tradicionais são utilizadas as enzimas amiloglucosidase, obtida do fungo *Aspergillus niger* ou  $\alpha$ -amilase, obtida do fungo *Aspergillus oryzae* e, em alguns trabalhos a combinação das duas enzimas (Haissig & Dickson 1979). A substituição de  $\alpha$ -amilase do fungo *Aspergillus oryzae* pela  $\alpha$ -amilase termoestável produzida pelo *Bacillus licheniformis* e a sua adição em dois intervalos de 30 minutos são passos importantes no novo método proposto, visando garantir

a hidrólise total do amido de reserva. Além disso, a utilização de enzimas altamente purificadas, isentas de contaminação com celulase e outras hidrolases, aumentou a confiabilidade do método, uma vez que possíveis contaminações com celulase e/ou pectinases levam à hidrólise das hemiceluloses e pecinas respectivamente (ambas presentes em todos os tecidos vegetais) vindo a mascarar os resultados, como observado, por exemplo, em cotilédones de jatobá com alto teor de xiloglucano (Tiné *et al.* 2000).

A utilização seqüencial das duas enzimas, a  $\alpha$ -amilase termoestável e a amiloglicosidase, é recomendada quando o teor de amido no material vegetal em análise for desconhecido, especialmente com relação ao teor de amilose e amilopectina, ao formato, área superficial, presença de poros e grau de compactação do grânulo de amido, ou ainda se este é um amido transitório ou de reserva. Esta combinação foi a mais adequada para todas as amostras. Por outro lado, quando algumas características do amido do material vegetal em uso já forem conhecidas e quando não houver interferência de carboidratos de reserva, pode-se baratear e tornar ainda mais rápido o método de extração de amido utilizando somente a amiloglicosidase ou o ácido perclórico. Algumas das amostras testadas, compostas por amido de reserva (grãos de arroz) ou por amido transitório (folhas de jatobá) apresentaram praticamente os mesmos teores de amido com os três protocolos testados.

Outra vantagem oferecida pelo método proposto neste trabalho é a dosagem da glucose pelo sistema da glucose oxidase e peroxidase associado aos reagentes 4-aminoantipirina e fenol (CENTERLAB), em substituição ao sistema glucose oxidase e peroxidase combinado com o regente importado ácido 2,2'-azino-bis 3-ethylbenzil-thiazolino-6-sulfônico (SIGMA). Esta substituição não ocasionou perda de qualidade na detecção de glucose livre e diminuiu significativamente os custos de análise.

Em resumo, as principais diferenças do método proposto com relação aos métodos descritos na literatura são o menor tempo de execução, a exclusão do período de gelatinização e a substituição das enzimas de hidrólise, especialmente a  $\alpha$ -amilase, por outras com pureza, sensibilidade e atividade superiores. Com estas alterações, este novo método permite uma estimativa precisa do conteúdo de amido em diversos tecidos de plantas, independentemente do grau de compactação e da presença de outros carboidratos de reserva.

## Agradecimentos

Os autores agradecem à FAPESP pelo apoio financeiro (processo 98/05124-8 - BIOTA) e pela bolsa de pós-doutorado concedida à MG; ao CNPq pelo apoio financeiro através de projeto Edital Universal (processo 303269/2002-2) e pela Bolsa de Produtividade em Pesquisa concedida a MSB e à CAPES pelas bolsas de mestrado e doutorado concedidas à PMFC e LIVA, respectivamente.

## Literatura citada

- Arêas, J.A.G. & Lajolo, F.M.** 1980. Determinação enzimática específica de amido, glicose, frutose e sacarose em bananas pré-climatéricas e climatéricas. *Anais de Farmácia e Química de São Paulo* 20: 307-318.
- Avigad, G. & Dey, P.M.** 1997. Carbohydrate metabolism: storage carbohydrates. *In: P. Dey & J. Harborne (eds.)*. Plant Biochemistry. Academic Press, London.
- Ball, S.G., Wal, M.H.B.J. & Visser, R.G.F.** 1998. Progress in understanding the biosynthesis of amylose. *Trends in Plant Science* 3: 462-467.
- Beck, E. & Ziegler, P.** 1989. Biosynthesis and degradation of starch in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 40: 95-117.
- Bennet, E.** 1955. Effect of aqueous perchloric acid on the xylan content of holocellulose from corn stalks. *Plant Physiology* 30: 562.
- Buckeridge, M.S., Santos, H.P. & Tiné, M.A.S.** 2000. Mobilisation of storage cell wall polysaccharides in seeds. *Plant Physiology & Biochemistry* 38: 141-156.
- Buckeridge, M.S., Santos, H.P., Tiné, M.A.S. & Aidar, M.P.M.** 2004. Mobilização de reservas. *In: A.G. Ferreira & F. Borghetti (eds.)*. Germinação, do básico ao aplicado. Artmed, Porto Alegre, pp. 163-185.
- Carpita, N.C. & Kanabus, J.** 1987. Extraction of starch by dimethyl sulfoxide and quantitation by enzymatic assay. *Analytical Biochemistry* 161: 132-139.
- Dubois, M., Gilles, A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. & Smith, F.** 1956. Colorimetric method of determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28: 350-355.
- Gorshokova, T.A., Wyatt, S.E., Salnikov, V.V., Gibeaut, D.M., Ibragimov, M.R., Lozovaya, V.V. & Carpita, N.C.** 1996. Cell-wall polysaccharides of developing flax plants. *Plant Physiology* 110: 721-729.
- Haissig, B.E. & Dickson, R.E.** 1979. Starch measurement in plant tissue using enzymatic hydrolysis. *Physiologia Plantarum* 47: 151-157.
- Jermyn, M.A.** 1956. A new method for the determination of ketohexoses in presence of aldohexoses. *Nature* 177: 38-39.

- Kaplan, F. & Guy, C.L.** 2005. RNA interference of *Arabidopsis* beta-amylase 8 prevents maltose accumulation upon cold shock and increases sensitivity of PSII photochemical efficiency to freezing stress. *Plant Journal* 44: 730-743.
- McCready, R.M.** 1970. Starch and Dextrin. *In*: M. Joslyn (ed.). *Methods in Food Analysis*. Academic Press, London, pp. 541-563.
- McCready, R.M., Guggolz, J., Silveira, V. & Owens, H.S.** 1950. Determination of starch and amylose in vegetables. Application to peas. *Analytical Chemistry* 22: 1156-1158.
- McRae, J.C.** 1971. Quantitative measurement of starch in very small amounts of leaf tissue. *Planta* 96: 101-108.
- Manners, D.** 1985. Starch. *In*: P. Dey & R. Dixon (eds.). *Biochemistry of Storage Carbohydrates in Green Plants*. Academic Press, London, pp. 149-203.
- Myers, A.M., Morell, M.K., James, M.G. & Ball, S.G.** 2000. Recent progress toward understanding biosynthesis of the amylopectin crystal. *Plant Physiology* 122: 989-997.
- Nelson, O. & Pan, D.** 1995. Starch synthesis in maize endosperms. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 46: 475-496.
- Purcher, G.W., Leavenworth, C.S. & Vickery, H.B.** 1948. Determination of starch in plant tissue. *Analytical Chemistry* 20: 850-853.
- Scheidig, A., Frohlich, A., Schulze, A., Lloyd, J.R. & Kossmann, J.** 2002. Downregulation of a chloroplast-target  $\beta$ -amylase leads to a starch excess phenotype in leaves. *Plant Journal* 30: 581-591.
- Smith, A.M., Zeeman, S.C. & Smith, S.M.** 2005. Starch degradation. *Annual Review of Plant Biology* 56: 73-98.
- Steiner, E.T. & Guthrie, J.D.** 1944. Determination of starch in sweet potato products and other plant materials. *Industrial & Engineering Chemistry* 16: 736-739.
- Sun, Z., Duke, S.H. & Henson, C.A.** 1995. The role of pea chloroplast  $\alpha$ -glucosidase in transitory starch degradation. *Plant Physiology* 108: 211-217.
- Tiné, M.A.S., Cortelazzo, A.L. & Buckeridge, M.S.** 2000. Xyloglucan mobilisation in cotyledons of developing plantlets of *Hymenaea courbaril* L. (Leguminosae-Caesalpinioideae). *Plant Science* 154: 117-126.
- Walker, G.J. & Hope, P.M.** 1963. The action of some  $\alpha$ -amylases on starch granules. *Biochemical Journal* 86: 452-462.
- Zeeman, S.C., Smith, S.M. & Smith, A.M.** 2004. The breakdown of starch in leaves. *New Phytologist* 163: 247-261.